米蛾体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与系统发育分析

丛　斌，付海滨，王翠敏*，戴秋慧**
（沈阳农业大学植物保护学院，害虫生物防治研究室，沈阳　110161）

摘要：*Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物体内的一类共生菌，它们参与多种调控寄主的生殖活动机制。通过对 *wsp* 基因的特异性扩增和测序，发现了 *Wolbachia* 在米蛾 *Corcyra cephalonica*（Stainton）体内的感染。利用所测序列和其他已发表的序列建立系统树，结果表明米蛾体内 *Wolbachia* 属于 B 大组的 Pip 类群，与其寄生物茧蜂及赤眼蜂中的 *Wolbachia* 各株系遗传距离相差较远。据此推测米蛾体内感染的 *Wolbachia* 不是由寄生物（茧蜂、赤眼蜂）水平传播所致。

关键词：*Wolbachia*；米蛾；*wsp* 基因；赤眼蜂
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2005)05-0815-04

Sequencing and phylogenetic analysis of the *wsp* gene of *Wolbachia* in *Corcyra cephalonica*（Stainton）（Lepidoptera：Pyralidae）

CONG Bin，FU Hai-Bin，WANG Cui-Min*，DAI Qiu-Hui**（Laboratory for Bio-Control of Pest Insects，College of Plant Protection，Shenyang Agricultural University，Shenyang 110161，China）

Abstract：*Wolbachia* is a common and widespread group of bacteria found in arthropods. These bacteria have evolved various mechanisms for manipulating reproduction of their hosts. The presence of *Wolbachia* in a laboratory population of *Corcyra cephalonica*（Stainton）was firstly identified based on amplification and sequencing part of the *wsp* gene. Aligned the obtained sequence with the published ones，the phylogenetic relationships among *Wolbachia* found in *C. cephalonica* and other insects were established. The *Wolbachia* found in *C. cephalonica* belong to the Pip group，far separated from the groups of *Wolbachia* found in braconid wasps and *Trichogramma* spp. It was so inferred that *Wolbachia* did not transmit horizontally between *C. cephalonica* and its parasitoids（*Apanteles* sp. and *Trichogramma* spp.）.

Key words：*Wolbachia*；*Corcyra cephalonica*；*wsp* gene；*Trichogramma* spp.

Wolbachia 属于 Proteobacteria 的 α 亚门，是一种立克次氏体，1924 年 Hertig 和 Wolbach 在尖音库蚊 *Culex pipiens* 的生殖组织里首次发现并将其命名为 *Wolbachia pipientis*（Hertig，1936）。*Wolbachia* 广泛分布于节肢动物体内（Werren *et al*.，1995b；West *et al*.，1998），Jeyaprakash 和 Hoy（2000）利用长 PCR 扩增方法发现 76%节肢动物感染有 *Wolbachia*。该内生菌通过卵的细胞质传播并参与多种调控其寄主生殖活动的机制，包括诱导胞质不亲和（cytoplasmic incompatibility）、诱导孤雌生殖（parthenogenesis-inducing）、诱导雌性化（feminizing）、杀雄（male killing）及增强雌性繁殖力和雄性生育力（fecundity and fertility-modifying）（Breeuwer and Werren，1990；Juchault *et al*.，1992；丛斌等，1998；Vavre *et al*.，1999；Dyson *et al*.，2002；付海滨等，2005）。大多数立克次氏体无法在寄主体外进行培养，所以很难用传统的微生物学方法对 *Wolbachia* 进行研究。随着分子生物学方法的快速发展，尤其是 PCR 技术的发展和分子系统学方法的应用使 *Wolbachia* 的检测有了重大突破（Stouthamer *et al*.，1993）。已有多种不同的目的基因用于 *Wolbachia* 的系统研究，其中包括 16S rDNA、23S rDNA、细胞分裂蛋白基因 *ftsZ*、细菌热激蛋白基因 *groE* 和细菌表面蛋白基因 *wsp*（O'Neill *et al*.，1992；Rousset *et al*.，1992；Werren *et*

基金项目：国家“十五”科技攻关项目(2001BA509130401)；国家自然科学基金项目（30170625）
作者简介：丛斌，男，1956 年生，辽宁宽甸县人，博士，教授，博士生导师，主要从事害虫生物防治与昆虫分子生态学研究，E-mail：cong_bin@21cn.com
* 现工作单位：深圳出入境检验检疫局；** 现工作单位：大连出入境检验检疫局
收稿日期 Received：2004-07-18；接受日期 Accepted：2005-01-22

al.,1995a;Masui *et al*.,1997;Braig *et al*.,1998)。

wsp 基因是一种编码 *Wolbachia* 表面蛋白的基因。Braig 等(1998)首次从感染了 *Wolbachia* 的果蝇 *Drosophila* 卵中成功地纯化了 *Wolbachia* 表面蛋白,随后进行了 *wsp* 基因的克隆和测序。Zhou 等(1998)在 *wsp* 序列分析的基础上,把A群和B群又细分为12个亚群(subgroups)。van Meer 等(1999)在A群中增加了1个亚群,在B群中增加了6个亚群,这样亚群数增加到19个,针对这些亚群设计了 *wsp* 基因诊断的PCR特异引物,建立了 *Wolbachia* 的基因诊断技术。

米蛾 *Corcyra cephalonica*(Stainton)是我国南方的一种仓储害虫,由于饲料容易获得,饲养简便,可以在室内终年繁殖,是繁育赤眼蜂的优良中间寄主之一。我们首次报道了 *Wolbachia* 在米蛾体内的感染,并将其与其他已知的 *Wolbachia* 株系之间的系统关系进行比较,讨论了 *Wolbachia* 在米蛾及其寄生蜂(茧蜂、赤眼蜂)之间水平传播的可能性,为进一步研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及来源

实验所用的米蛾采自吉林省四平市储藏玉米中,由吉林省农业科学院植物保护研究所引进,于本实验室26℃、相对湿度80%条件下人工饲料饲养以建立种群;米蛾寄生茧蜂(绒茧蜂属 *Apanteles* sp.)是出自该种群米蛾幼虫;食胚赤眼蜂 *Trichogramma embryophagum* 由联邦德国农林生物研究中心生物防治研究所提供,为产雌孤雌生殖的赤眼蜂,在实验中用作阳性对照。

1.2 米蛾体内总DNA的提取

将1头去掉前后翅的米蛾成虫置于装有300 μL DNA提取裂解液(1% SDS,10 mmol/L Tris-HCl,25 mmol/L NaCl,25 mmol/L EDTA)的1.5 mL离心管中,加入4 μL蛋白酶K溶液(20 mg/mL),56℃温浴3 h以上。用酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提2次,以2 000×g 离心10 min,在上清液中加入0.2倍体积的乙酸铵溶液(10 mol/L)和2倍体积的无水乙醇,-20℃过夜保存,以2 000×g 离心10 min,沉淀用预冷的70%乙醇洗涤后离心,沉淀在无菌工作台上风干后溶于10 μL双蒸水中,4℃保存备用。

1.3 *wsp* 基因的PCR扩增及电泳检测

wsp 基因的PCR扩增参照 Zhou 等(1998)方法。扩增引物为:

wsp 81F:5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′;

wsp 691R:5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′。

在20 μL反应体积中进行PCR反应,反应体系为13.5 μL ddH$_2$O,2 μL 10×缓冲液,2 μL 25 mmol/L MgCl$_2$,0.5 μL dNTPs(每种10 mmol/L),0.5 μL 20 μmol/L的正向和反向引物,1 U的Taq酶。在MJ-PTC200扩增仪上进行PCR扩增反应,PCR程序为:首先在94℃预变性3 min;然后94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min扩增35个循环;最后72℃延伸7 min。扩增反应结束后,将PCR特异性扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳检测,溴化乙锭(EB)染色,以明确 *wsp* 基因的存在与否及扩增片段的大小。

1.4 序列测定

将检测有 *wsp* 基因片段的PCR粗产物50 μL委托宝生物工程(大连)有限公司纯化和测序。为确保测序结果的准确性,在ABI PRISM™ 377XL自动测序仪上进行双向测序。

1.5 序列分析

将所测得的 *wsp* 序列在GenBank中作BLAST搜索,利用核酸序列分析软件DNAMAN version 4.0对序列进行排序剪裁,并将完整 *wsp* 序列提交到GenBank注册。结合GenBank中已有的 *wsp* 序列对所测得的 *wsp* 序列进行系统分析,利用MegAlign方法(DNAStar 4.05)对所有序列进行比对分析,系统树的构建采用软件MEGA version 2.1,建树方法采用常用的UPMGA和Neighbor-Joining(NJ)方法,并分别根据最小进化(ME)和最大简约(MP)两种假定建树,最后运用Bootstrap 1 000次对进化数进行检验。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

利用 *wsp* 基因的一对通用引物(81F,691R)成功地从米蛾的总DNA中扩增到一段575 bp的 *wsp* 基因片段(图1),该基因片段已经测序并提交到GenBank(登录号为AY634679)。同时从米蛾幼虫的一种寄生茧蜂中也检测到了 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段,测序结果为572 bp,该实验为米蛾及其寄生茧蜂体内有 *Wolbachia* 感染提供了分子生物学证据。

2.2 系统聚类分析

对所测得的米蛾及其寄生茧蜂体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列以及已知的其他菌株序列利用MEGA软件进行聚类分析得到UPMGA系统树

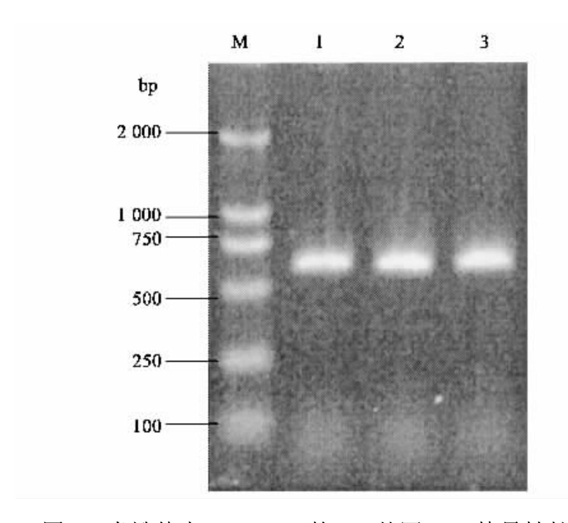


图 1 米蛾体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因 PCR 特异性扩增

Fig.1 PCR amplification of the *wsp* gene from *Wolbachia* in *Corcyra cephalonica*

M：标准分子量 Marker（DL2000）；1. 米蛾 *C. cephalonica*；2. 茧蜂 *Apanteles* sp.；3. 阳性对照 Positive control.

（图 2）。UPMGA 系统树中，米蛾体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列与尖音库蚊 *Culex pipiens*（*ESPRO*）和果蝇 *Drosophila simulans*（*Noumea*）体内感染的株系归在 1 个组内，它们统归为 B 大组的 Pip 组类群中，而寄生茧蜂 *Apanteles* sp. 体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列与杂拟谷盗 *Tribolium confusum* 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内感染的株系归为 B 大组的 Con 组类群中。二者之间以及与已知的赤眼蜂属中的 *Wolbachia* 各株系间遗传距离相距甚远，由此可知：米蛾体内感染的 *Wolbachia* 不是由寄生物（茧蜂和赤眼蜂）水平传播所致。

3 讨论

本研究发现米蛾成虫体内有 *Wolbachia* 感染，在 UPMGA 系统树中可以看到，米蛾体内感染的 *Wolbachia* 归为 B 大组的 Pip 组类群中，而与其寄生茧蜂和已知赤眼蜂属寄生蜂感染的 *Wolbachia* 相距较远，可以证实米蛾体内感染的 *Wolbachia* 并非由于 *Wolbachia* 在三者之间的水平转染所致，三者可能均为独立感染而来或其他未知的种间水平传播所致。

赤眼蜂是全世界害虫生物防治中研究最多、应用最广的一类卵寄生性天敌，根据 Stouthamer（1993）的解释，携带 *Wolbachia* 的赤眼蜂的潜在优势是：（a）无雄性产生，从而使赤眼蜂的种群增长速率增加；（b）仅产生雌性，降低规模化培养的成本；（c）在低密度种群下，孤雌生殖赤眼蜂不需要花费时间来寻找雄性交配，使其更容易进入新生境并建立种群；另外，两性生殖的赤眼蜂通过与携带有 *Wolbachia* 赤眼蜂接触而成为产雌孤雌生殖的赤眼蜂，使其在生物防治中具有更大的潜能。

米蛾是繁育赤眼蜂的优良中间寄主之一，但 *Wolbachia* 在米蛾体内存在的部位和对寄主米蛾生殖活动的调控尚不得而知，米蛾体内感染的 *Wolbachia* 是由何种方式感染得来，*Wolbachia* 能否在米蛾及其寄生物（茧蜂、赤眼蜂）三者之间相互水平传播，有待进一步深入研究。

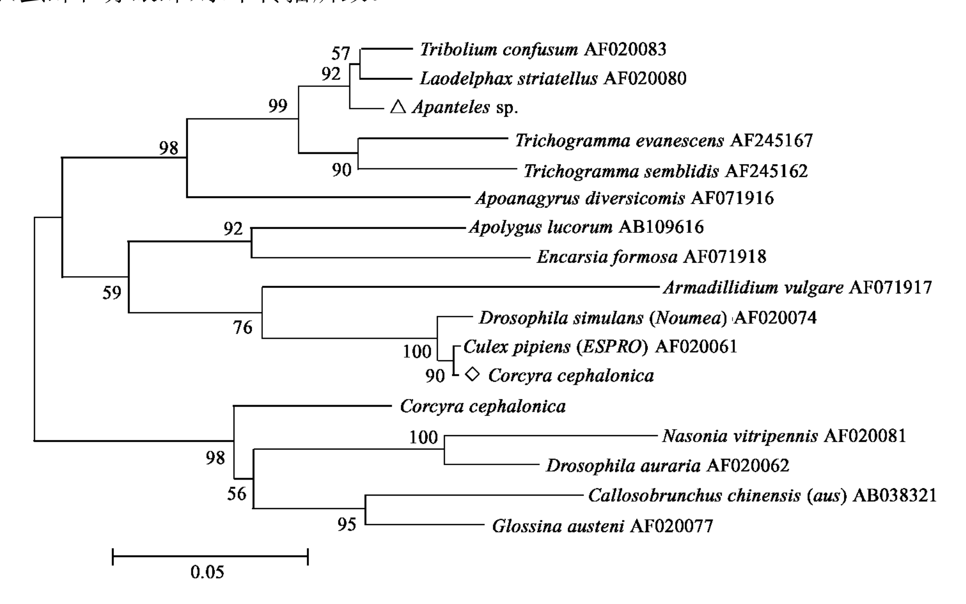


图 2 基于 *wsp* 序列的 *Wolbachia* 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Wolbachia* based on the *wsp* sequences

△茧蜂 *Apanteles* sp.；◇ 米蛾 *C. cephalonica*.

致谢 中国农业科学院植物保护研究所王振营博士审阅初稿并提出宝贵修改建议和意见，特此致谢。

参考文献（References）

Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL, 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacterial.*, 180: 2 373 – 2 378.

Breeuwer JAJ, Werren JH, 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346: 558 – 560.

Cong B, Stouthamer R, Schilthuizen R, 1998. Parthenogenesis of wasps and *Wolbachia*. In: Cheng DF ed. Prospects of Plant Protection in 21 Century. Beijing: China Science and Technology Press. 665 – 669.[丛斌，Stouthamer R，Schilthuizen R，1998. *Wolbachia* 与寄生蜂的孤雌生殖. 见：程登发主编. 植物保护21世纪展望. 北京：中国科学技术出版社. 665 – 669]

Dyson EAM, Kamath MK, Hurst GD, 2002. *Wolbachia* infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera: Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. *Heredity*, 88(3): 166 – 171.

Fu HB, Cong B, Dai QH, 2005. *Wolbachia* endosymbionts in *Trichogramma* and their impacts on the hosts. *Chinese Journal of Biological Control*, 21(2): 70 – 73.[付海滨，丛斌，戴秋慧，2005. 赤眼蜂内生菌沃尔巴克氏体及其对宿主影响. 中国生物防治，21(2): 70 – 73]

Hertig M, 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. *et* sp. n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28: 453 – 486.

Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9(4): 393 – 405.

Juchault P, Rigaud T, Mocquard JP, 1992. Evolution of sex-determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Isopoda): competition between two feminizing parasitic sex factors. *Heredity*, 69: 382 – 390.

Masui S, Sasaki T, Ishikawa H, 1997. *groE*-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. *Zool. Sci.*, 14(4): 701 – 706.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2 699 – 2 702.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M, 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 250: 91 – 98.

Stouthamer R, 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*, 38: 3 – 6.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Luck RF, Werren JH, 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361: 66 – 68.

van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R, 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia*, based on the *wsp* gene. *Insect Mol. Biol.*, 8: 399 – 408.

Vavre F, Girin C, Bouletreau M, 1999. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Mol. Biol.*, 8(1): 67 – 72.

Werren JH, Windsor DM, Guo LR, 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 262: 197 – 204.

Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 261: 55 – 71.

West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray CJ, 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol. Ecol.*, 7: 1 457 – 1 465.

Zhou W, Rousset F, O'Neill SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 509 – 515.

（责任编辑：黄玲巧）